# Tumor Necrosis Factor-α에 의한 사람 코점막 상피세포 미세구조의 변화

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
김경수 · 이정권 · 박인용 · 김희남 · 윤주헌

= Abstract =

## Ultrastructural Changes of Cultured Human Nasal Epithelial Cells by Tumor Necrosis Factor-α

**Kyung Su Kim, M.D., Jeung Gweon Lee, M.D., In Yong Park, M.D., Hee Nam Kim, M.D., Joo-Heon Yoon, M.D.**

*Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background** : Tumor necrosis factor(TNF)-α plays a critical role in normal host resistance to infections and to the growth of malignant tumor. Among its actions, the induction of the cytokines and the involved factors in the inflammatory reaction is the most important action of TNF-α Until now, the functional role of TNF-α has been intensively studied, but the morphological effects on epithelial cells by it was not.

**Objectives** : The aim of this study was to observe the ultrastructural changes of cultured human nasal epithelial cell(HNEC) by TNF-α

Materials and Methods:The HNEC culture was done as floating method and the epithelial cells on the floating 14th day were cultured in the culture media containing TNF-α(0.1, 1, 10, 100ng/ml) for 48 hours. The observation was done with scanning electron microscopy(SEM) and transmission electron microscopy. For the quantitation of area of ciliated and secretory epithelial cells, SEM photo(1000 magnification) was taken and each area per 60 $\mu m^2$ was calculated.

**Results** : The ultrastructural changes were observed from 1 ng/ml through 100 ng/ml TNF-α and the changes(damage of cilia, increase of mitochondria, intracellular vacuole, increase of intercellular space and the increase of secretory epithelial cell area) were similar to the inflammatory changes in vivo.

**Conclusion** : These results suggest that the ultrastructural changes of culture HNECs are induced by TNF-α The study on the reversibility of the changes and the estimation of size and numbers of cells with be required. **(Korean J Otolaryngol 40:5, 1997)**

KEY WORDS : TNF-α· Human nasal epithelial cell culture · Electron microscopy.

논문접수일 : 1997년 2월 13일
심사통과일 : 1997년 4월 14일

## 서 론

Tumor necrosis factor(TMF) - α는 종양이 있는 쥐에 Bacillus Calmette Guerin(BCG) 또는 당지질을 주사하여 얻은 혈청에서 발견된 물질로[1], 당지질 lipase를 억제하여 악액질(cachexia) 상태를 유도하는 성질을 지녀 일명 cachetin이라 불리기도 한다[2]. TNF - α는 주로 활성형 임파구와 대식세포에서 생성되며 그 외 중성구, NK 세포, LAK 세포, 성상세포, 내피세포, 평활근 등에서 생성된다[3]. TNF 수용체에는 α와 β 수용체가 존재하며, 이들은 면역학적으로 확실히 구분이 되고 세포내 신호전달은 각기 다른 경로를 통해 이루어진다[4]. 각 수용체는 TNF - α나 β에 모두 결합이 가능하며 이런 점으로 보아 수용체 자체의 역할이 다르다. 즉, TNF - α 수용체는 세포 용해작용에 관여하며, TNF - β 수용체는 임파구의 증식 및 조절작용에 관여한다[5].

호흡 점막의 경우 여러 염증성 자극에 노출된 후 arachidonic acid 대사물, 혈소판 활성인자, intercellular adhesion molecule - 1, 그리고 전구염증 cytokine인 IL - 1, IL - 6, IL - 8, granulocyte - macrophage colonystimulating factor(GM - CSF), TNF - α등을 생성하며 이러한 물질들에 의해 염증세포가 자극부위로 모여 염증반응을 일으키게 된다[6]. 최근 전구염증 cytokine인 TNF - α가 호흡기 상피세포에 미치는 영향에 대해서 많은 연구가 이루어졌다. Becker등[7]은 TNF - α에 의해 사람 코점막 상피세포에서 IL - 8이 증가한다고 하였고, Bradding등[8]은 사람 코점막 상피세포의 급, 만성 염증시 IL - 1과 세포의 부착력이 증가하며, T세포, B세포, NK세포 등의 활성화에 TNF - α가 관여한다고 하였다. 이와같이 TNF - α는 코점막을 포함한 호흡기 상피세포의 급성 및 만성 염증의 유도 및 유지에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다.

그러나 지금까지의 연구상 TNF - α가 인체에서 발생하는 급, 만성 염증의 형태학적 변화에 직접적으로 관여한다는 것은 입증이 되지 않았다. 이에 연구자는 배양된 코점막 상피세포에 TNF - α를 첨가 배양하여 TNF - α에 의해 코점막 상피세포의 미세구조에 변화가 야기되는지를 알고자 하였다. 또한 미세구조에 변화가 야기된다면 TNF - α의 농도에 따라 변화에 차이가 있는가를 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포분리 및 배양

부비동 수술과 비갑개 절제술중 채취한 사람 하비갑개 점막 및 비용을 실험재료로 사용하였다. 분리 및 배양법은 세포를 floating시켜 배양하는 윤주헌 등[9]과 이정권 등[10]의 방법을 이용하였다. 이를 약술하면, 상피세포를 분리하기 위하여, 채취한 조직들은 DMEM/F12 1:1 혼합액에 0.1% type XIV protease(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 넣은 용액에 16 24시간 동안 4℃에서 처리하여 단일세포로 분리하였다. 유리된 상피세포를 항생제를 함유하는 DMEM/F12 용액으로 세척 후 10ng/ml cholera toxin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), $10^{-7}$M retinoic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 10% NU serum(Collaborative Research Inc., Bedford, MA, USA) 및 항생제를 포함하는 DMEM/F12 혼합액에 부유시켰다.

이를 플라스틱 배양용기에 평판한 후 37℃에서 1시간둔 다음 부유된 상피세포를 원심분리하여 pellets을 얻은 후 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 계측하여 $5\times10^3$cells/cm$^2$으로 나누어 1.5ml 배양액과 함께 콜라젠 겔위에 배양하였다. 콜라젠 겔은 제1형 콜라젠겔(Collaborative Research Inc., Bedford, MA, USA) 5 volumes, 5x DMEM 2 volumes, 증류수 2 volumes, 1 M $NaHCO_3$ 1 volume으로 혼합하여 4℃에서 35mm 배양용기에 1.5ml씩 넣은 다음 37℃에서 30분간 굳힌 후 사용하였다. 배양은 5% $CO_2$, 95% air(37℃)에서 하였고 처음 배양액은 48시간 후에 갈아주었으며, 그후 3일에 한번씩 갈아주어 합류를 이룰 때까지 위상차 현미경으로 관찰하였다.

콜라젠 겔위에서 배양하여 9  10일 후에 합류를 이

룬 상피세포를 박리자를 이용하여 콜라젠 겔과 함께 박리하여 플라스틱 용기로부터 들어 올려 5ml 배양액을 넣은 60mm 배양용기에 옮겨 floating시켰다. 이때 상피세포의 위쪽은 항상 배양액 내에 있게 하였다.

### 2. 항 cytokeratin 및 vimentin 면역조직화학 염색

상피세포들을 콜라젠으로 코팅한 glass coverslips위에 배양하여 합류를 이루었을 때 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 그리고 4% 중성 formalin용액에 4 6시간 동안 고정하여 파라핀에 포매한 다음, 포매된 조직을 4μm 두께로 잘라 면역조직화학 염색을 시행하였다. 면역조직화학 염색은 0.3% 과산화수소를 함유한 100% 메탄올용액에 15분, 1% bovine serum albumin 용액에 20분간 처치하였다. 일차항체로 상피세포의 cytokeratin에 반응하응 anti-pancytokeratin polyclonal antibody(DAKO, Carpinteria, CA, USA) 1:10 희석용액과 섬유아세포 및 내피세포의 intermediate filament에 결합하는 vimentin에 대한 항체인 anti-vimentin 항체(DAKO, Carpinteria, CA, USA) 1:40 희석용액을 이용하여 1시간동안 반응을 시켰으며, 음성 대조군으로 일차항체를 빼고 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotin-labelled antibody와 peroxidase-labelled streptoavidin(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)을 반응시킨 다음 3-amino-9-ethyl carbazole로 발색반응시켜 hematoxylin으로 대조염색 후 광학현미경(Olympus VANOX-S, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

### 3. TNF-α첨가 배양시 농도에 따른 주사 및 투과 전자현미경 관찰

위의 방법으로 배양된 세포가 생체조직과 가장 유사한 분화양상을 보이는 floating 14일째[9)10)] TNF-α를 첨가하여 배양하였다. 배양된 세포가 TNF-α에 의해 변화가 야기되는 농도를 결정하기 위해 TNF-α의 농도를 정상 혈청농도인 0.3 7.2pg/ml를 참조하여 이의 10배수씩 증강하였다. 즉, 0ng/ml(대조군), 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml의 농도로 하여 각각을 첨가한 배양액에 48시간 배양한 다음 주사 및 투과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

주사 전자현미경 관찰을 위해서는 콜라젠 겔위에 배양된 상피세포를 2.5% glutaraldehyde에 4℃에서 4 6시간 고정한 후 0.1M phosphate buffer로 세척하였다. 1% osmium tetroxide에 1시간 동안 다시 고정한 다음 금방 만들어 여과한 2% tannic acid에 4℃에서 밤새 처리한 후 다시 1% $OsO_4$에 30분간 고정하였다. 탈수과정을 거쳐 critical point drying 시킨 후 gold coating하여 관찰하였다. 투과 전자현미경 관찰을 위해서는 콜라젠 겔위에 배양된 상피세포를 2.5% glutaraldehyde에 4℃에서 4 6시간 고정한 후 0.1M phosphate buffer로 세척하였다. 1% osmium tetroxide에 1시간 다시 고정한 다음 탈수시키고 Epon 812에 포매하였다. 포매된 조직을 80nm 두께로 썰어 uranyl acetate에 실온에서 6분, lead citrate에 실온에서 3분간 염색하여 관찰하였다.

섬모상피세포와 분비상피세포의 변화양상을 알기위해 주사 전자현미경 1000배 배율로 임의로 선택한 10곳에서 사진을 찍은 후 60$\mu m^2$내의 섬모상피와 분비상피세포로 생각되는 비섬모상피세포의 면적을 Optimas program(Optimas, Edmonds, WA, USA)을 이용하여 구하였다. 통계처리는 SPSS/PC$^+$ 통계 프로그램을 이용하여 one way ANOVA로 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. 면역조직화학 염색 소견

배양된 세포들이 상피세포임을 확인하기 위하여 pancytokeratin에 대한 항체로 면역조직화학 염색을 시행한 결과 대부분의 세포들에서 세포질의 cytokeratin에 양성 반응을 보였다(Fig. 1A). 또한 섬유아세포 및 내피세포에 결합하는 anti-vimentin 항체로 면역조직화학 염색을 시행한 소견은 대부분의 세포에서 음성반응을 보였다(Fig. 1B). 이러한 소견으로 배양된 세포는 상피세포임을 확인할 수 있었다.

### 2. TNF-α 첨가 배양시 농도에 따른 주사 및 투과 전자현미경 소견

Floating 14일째 TNF-α를 농도별(0.1ng/ml, 1ng/

ml, 10ng/ml, 100ng/ml)로 첨가하여 48시간 동안 배양한 다음 TNF-α없이 배양한 대조군과 비교하여 주사 및 투과 전자현미경적 소견을 관찰하였다.

1) TNF-α 0.1ng/ml 첨가 배양군

Floating 16일째의 대조군에서는 주사 전자현미경상 섬모가 밀집되어 있고 각각의 표면이 매끄러우며 분비상피세포는 군데군데 섬모가 없는 부위에서 관찰되었다. 투과 전자현미경상 표면에 많은 수의 섬모가 돌출되어 있는 섬모상피세포가 관찰되었으며 상피세포간의 세포 간격은 조밀한 양상이었으며, 미세융모로 덮여 있는 분비상

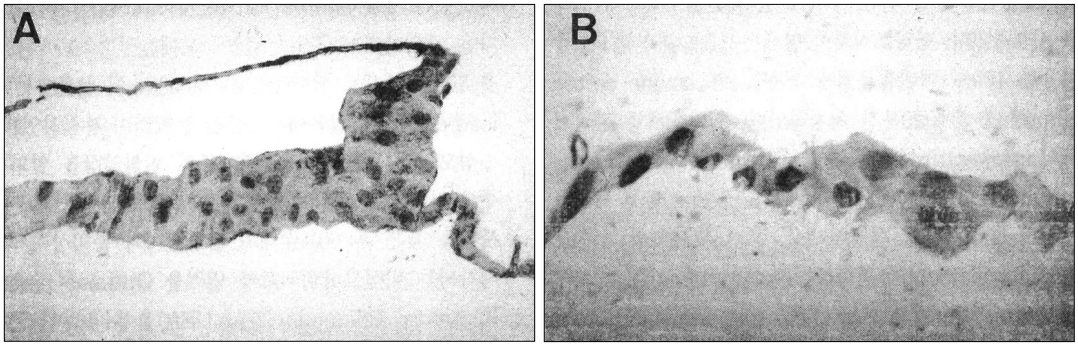


**Fig. 1.** Immunohistochemical staining of cultured human nasal epithelial cells(HNEC). A : The positive reaction to antipancytokeratin antibody is noted in the confluence stage of cultured HNEC. B : The negative reaction to antivimentin antibody is noted in the confluence stage of cultured HNEC(×200).

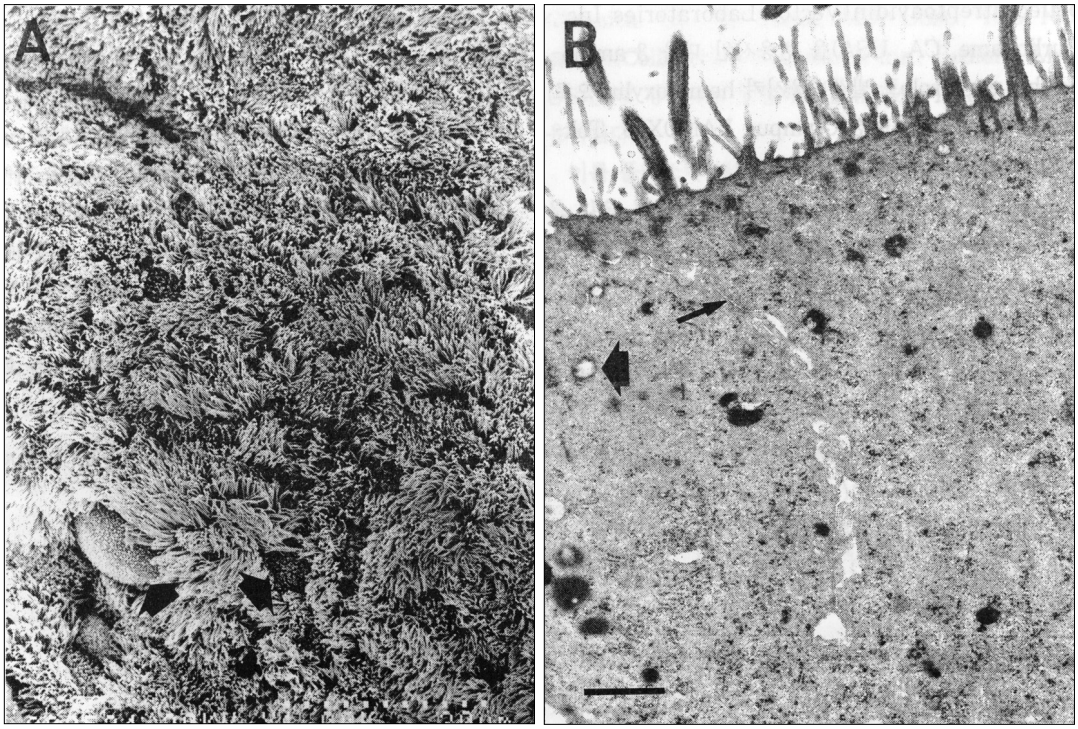


**Fig. 2.** Electron microscopic finding of control(no addition of TNF-α). A : Scanning electron microscopic finding. The cilia are dense and smooth-surfaced and some secretory cells(arrow) are noted(×1000). B : Transmission electron microscopic finding. The cilia protrude from the surface of cell. The intercellular space (thin arrow) is tight and the intracellular secretory granule(thick arrow) is electron-lucent(×12600, scale bar:1 μm)

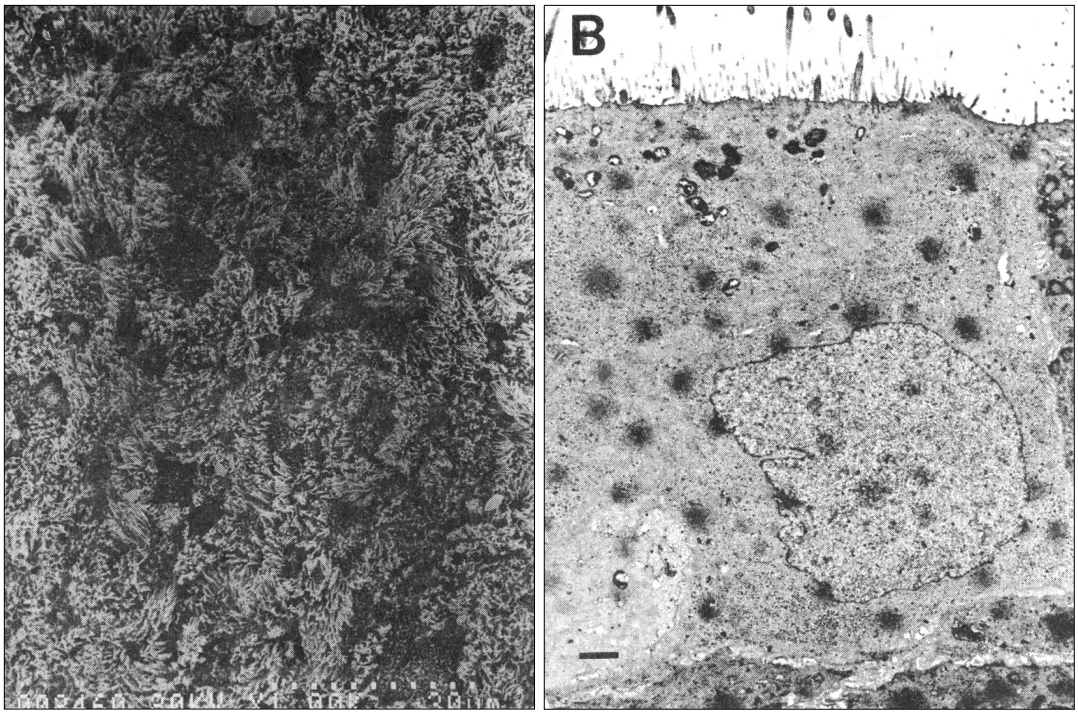


**Fig. 3.** Electron microscopic finding on addition of TNF-α 0.1ng/ml. A : Scanning electron microscopic finding. The cilia are dense and smooth-surfaced and some secretory cells(arrow) are noted(×1000). B : Transmission electron microscopic finding. The cilia protrude from the surface of cell and the intercellular space is tight(×5400, scale bar:1 μm).

피세포가 관찰되었다. 분비상피세포내의 분비과립은 대부분 전자 투과밀도의 양상으로 관찰되었다(Fig. 2). 섬모상피세포와 분비상피세포의 면적은 각각 50.9±9.1 μm$^2$, 9.1±5.2 μm$^2$였다.

TNF-α 0.1ng/ml의 농도에서는 주사 및 투과 전자현미경상 대조군과 동일한 양상을 보였으며(Fig. 3). 섬모상피세포와 분비상피세포의 면적은 각각 49.9±8. 8 μm$^2$, 10.1±4.7 μm$^2$으로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1).

**Table 1.** Area of ciliated epithelial cells and secretory epithelial cells after culturing with TNF-α for 48 hours

| TNF-α (ng/ml) | Ciliated epitheliaIn cell( μm$^2$) | Secretory epithelial cells( μm$^2$) |
|---|---|---|
| 0 | 50.9±9.1 | 9.1±5.2 |
| 0.1 | 49.9±8.8 | 10.1±4.7 |
| 1 | 43.7±6.3* | 16.3±7.0* |
| 10 | 41.0±5.6* | 19.0±6.1* |
| 100 | 35.7±4.9* | 24.3±5.8* |

* : p<0.05(compared with TNF-α 0ng/ml)

### 2) TNF-α 1, 10ng/ml 첨가 배양군

TNF-α 1ng/ml로 처치시 주사 전자현미경상 섬모의 손상과 분비물이 증가하여 섬모의 표면에 부착된 모습이 관찰되었다. 투과 전자현미경상 대조군과 비교하여 섬모가 짧아져 있으며, 섬모상피세포의 세포질에 공포가 관찰되었고 미토콘드리아가 증가한 양상이었다. 상피세포간의 세포간격이 증가된 모습을 보였는데, 상피의 하부는 세포간 간격이 넓어져 있으나 상부는 인접한 세포가 정상적인 tight junction을 보였다(Fig. 4). 섬모상피세포와 분비상피세포의 면적은 평균 43.7±6.3 μm$^2$과 16.3±7.0 μm$^2$으로 대조군에 비해 분비상피세포의 면적이 유의하게 증가하였다(Table 1)($p<0.05$).

TNF-α 10ng/ml로 처치한 경우 주사 전자현미경상 1ng/ml로 처치한 경우와 동일한 소견을 보였으며(Fig.

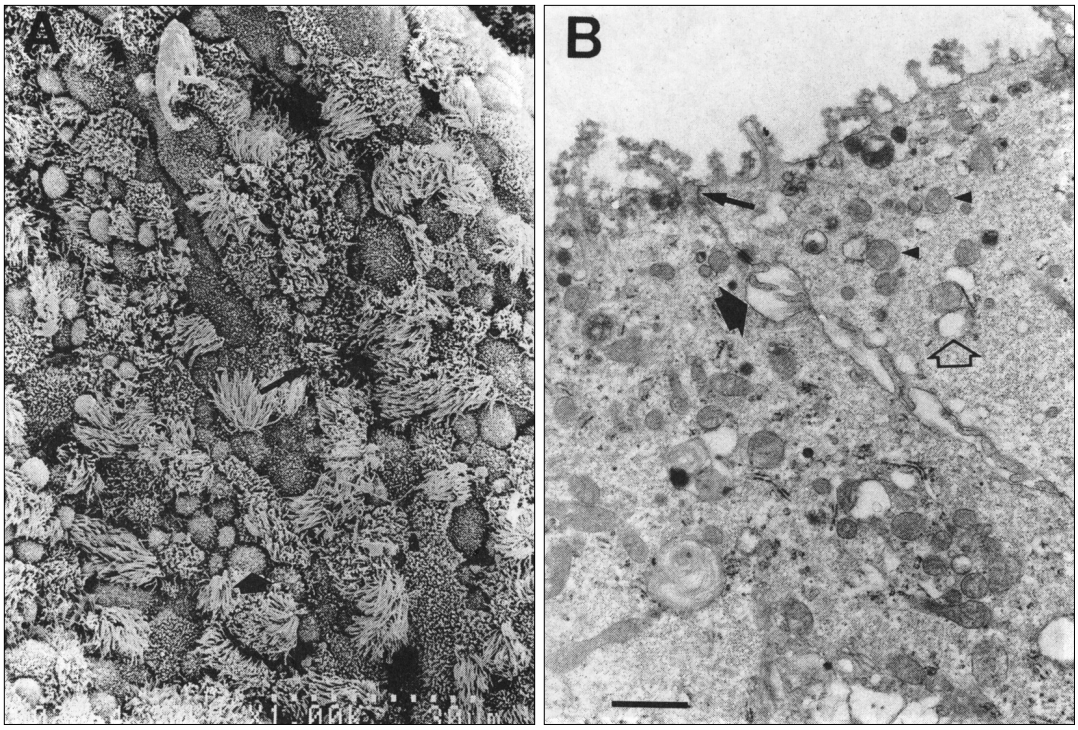


**Fig. 4.** Electron microscopic finding on addition of TNF-α 1ng/ml. A : Scanning electron microscopic finding. The damaged cilia(thin arrow) and the increase of secretory cell area(thick arrow) and noted(×1000). B : Transmission electron microscopic finding. The shortage of cilia, intracellular vacuoles(blank arrow), and the increase of mitochondria(arrow head) are noted. The intercellular space is tight in the upper portion but it is loose and wide in the lower portion(×6400, scale bar:1 μm).

5), 투과 전자현미경상 분비상피세포 세포질내의 분비과립은 대부분이 전자 투과밀도의 과립이었다(Fig. 6). 섬모상피세포와 분비상피세포의 면적은 평균 41.0±5.6 $\mu m^2$과 19.0±5.8 $\mu m^2$으로 대조군에 비해 분비상피세포의 면적이 유의하게 증가하였다(Table 1)($p<0.05$).

### 3) TNF-α 100ng/ml 첨가배양군

TNF-α 100ng/ml로 처치시 주사 전자현미경상 섬모는 손상되어 부분적으로는 비섬모화된 부위가 관찰되었고, 투과 전자현미경상 섬모는 짧아진 상태였다. 분비상피세포의 세포질내 공포가 관찰되었고 전자 투과밀도 및 불투과밀도의 분비과립이 있었으며 전자 투과밀도의 분비과립이 더 많은 양상이었다(Fig. 7). 섬모상피세포와 분비상피세포의 면적은 평균 35.7±4.9 $\mu m^2$과 24.3±5.8 $\mu m^2$으로 대조군에 비해 분비상피세포의 면적이 유의하게 증가하였다(Table 1)($p<0.05$).

## 고 찰

코점막의 중요한 기능의 하나인 신체 방어기전에는 분비성 면역글로부린 A, lysozyme, lactoferrin, protease inhibitor, 점액층, 섬모 등이 관여하며 상피세포 자체의 형태 유지도 중요한 방어기전의 하나로 간주되고 잇다. 즉, 코점막의 세포간 간격의 유지와 정상적인 섬모운동, 미세융모 및 기저막 등이 비특이적 인자로 일차적 방어막의 역할을 한다[11]. 이러한 이유로 급, 만성 코점막 질환시 상피세포의 형태학적 변화는 일차적 방어막의 파괴로 인하여 이차 감염의 시초에 중요한 역할을 하므로 형태변화에 관련된 인자에 대한 연구가 중요하다 하겠다.

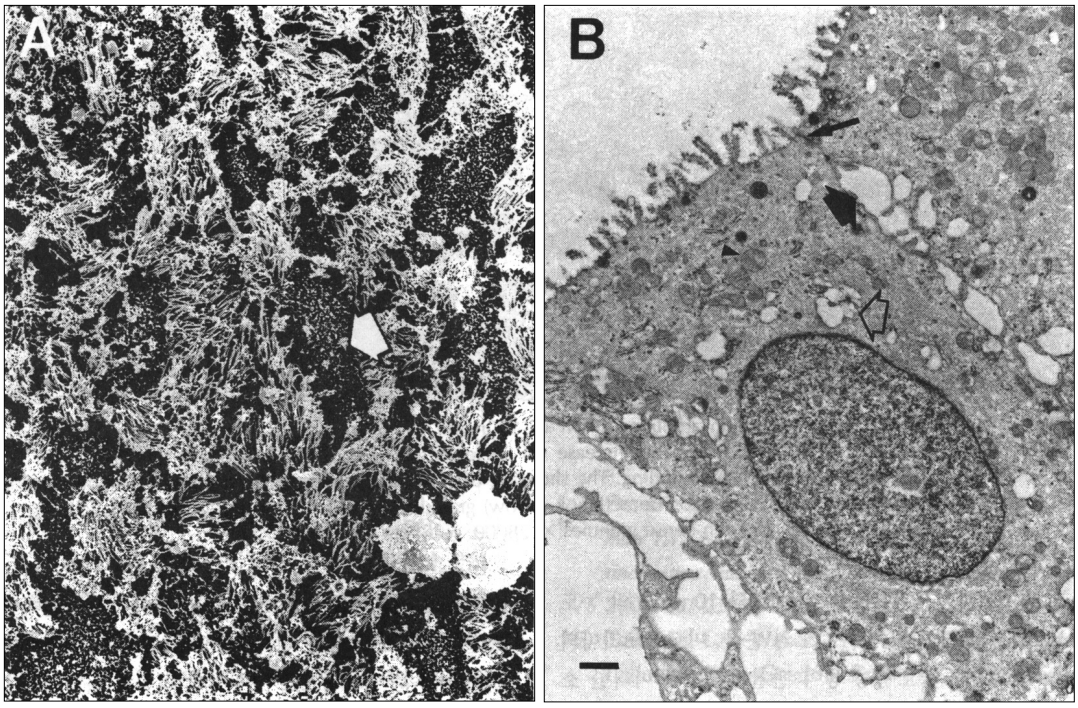


**Fig. 5.** Electron microscopic finding on addition of TNF-α 10ng/ml. A : Scanning electron microscopic finding. The damaged cilia and the increase of secretory cell area(arrow) are noted(×1000). B : Transmission electron microscopic finding. The shortage of cilia, intracellular vacuoles(blank arrow), and the increase of mitochondria(arrow head) and noted. The intercellular space is tight in the upper portion but it is loose and wide in the lower portion(×6400, scale bar:1 μm).

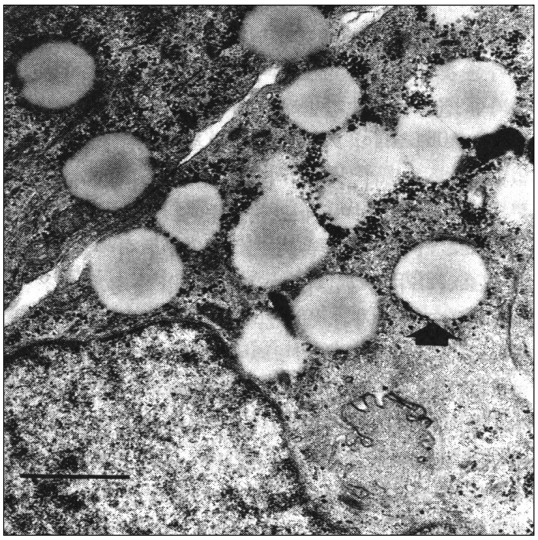

**Fig. 6.** Transmission electron microscopic finding of secretory granules on addition of TNF-α 10ng/ml. The intracellular granules are mostly electron-lucent(×28000, scale bar : 1 μm).

TNF-α의 농도는 정상 성인 혈청의 농도인 0.3 7.2pg/ml[12]와 콧물내의 농도인 2 12pg/ml[13]를 감안하여 0.1ng/ml의 10배수씩 증가하였다. 이러한 농도는 TNF-α로 형태학적 변화를 유도한 Yanagisawa등[14]과 Margot등[15]의 실험농도인 0.1 100ng/ml와 같은 농도였다. 본 실험의 경우 0.1ng/ml에서는 상피세포에 변화가 관찰되지 않았으며, 100ng/ml의 경우 세포의 완전괴사나 파괴의 소견은 관찰되지 않았다. 또한 이 농도에서의 분비과립은 전자 투과밀도의 과립으로 정상 생체에서와 같은 소견이었다. 이와 같은 결과는 변화를 유도하는 최저 농도가 0.1ng/ml보다는 높으며, 100ng/ml에서도 세포의 복원이 가능하다는 것을 의미하므로 본 실험에서 생체의 양상을 유추하는 것이 가능하리라 생각된다.

첨가 배양시간을 48시간으로 정한 것은 예비실험상 실험농도로 1일간 첨가시 미세구조의 변화가 미미하였

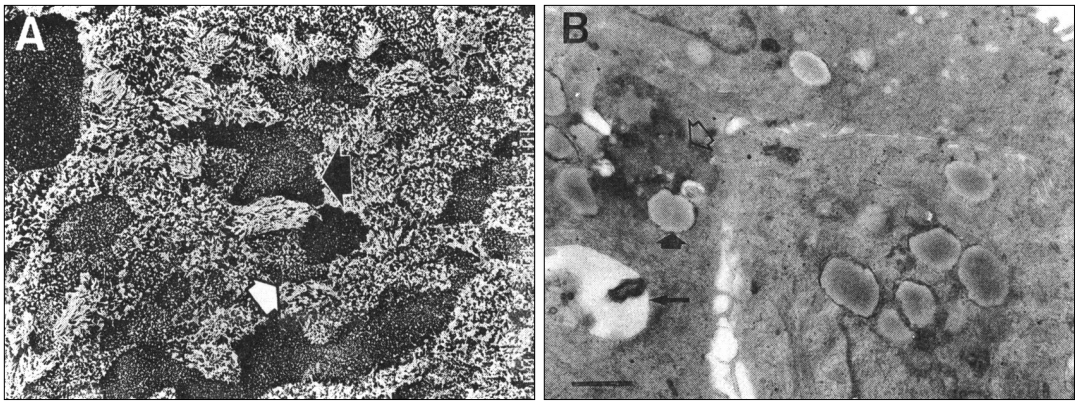


**Fig. 7.** Electron microscopic finding on addition of TNF-α 100ng/ml. A : Scanning electron microscopic finding. The non-ciliated area(white arrow) and the increase of secretory cell area(black arrow) are noted(×1000). B : Transmission electron microscopic finding. The shortage of cilia, intracellular vacuoles(thin arrow), the electron-lucent(black arrow) and the electron-dense(black arrow) granules are noted. The electron-lucent granules are more numerous than the electron-dense granules(×28000, scale bar:1 μm).

고, 3일간 첨가시 콜라젠 겔에서 세포들이 탈락되었기 때문에 특징적인 변화가 유도되는 것으로 생각되었기 때문이었다. 결과를 평가하는 방법의 일부로, 섬모상피세포와 분비상피세포의 변화양상을 주사 전자현미경 사진을 이용하여 면적을 구하여 고찰하였다. 이는 실험상 유도될 수 있는 세포부종으로 인하여 농도에 따라 세포의 크기가 서로 상이하게 되므로, 세포의 수를 계측하여 변화양상을 보는 것보다는 세포의 크기를 간접적으로 측정하는 방법으로 세포의 면적을 구하여 변화를 보는 것이 변화의 양상을 파악하는데 더욱 근접한 방법으로 생각되어 면적을 구하여 비교하였다.

본 연구결과에서 TNF-α 1ng/ml와 10ng/ml의 농도에서 섬모상피세포의 경우 섬모의 손상, 미토콘드리아의 증가, 세포질내 공포형성 등이 관찰되었는데 이러한 소견들이 생체의 급성 비염 및 급, 만성 부비동염 때의 소견과 일치한다면 실험의 결과를 TNF-α 첨가 배양에 의한 직접적인 상피세포의 변화로 생각할 수 있을 것이다.

사람 코점막에 발생하는 여러 염증 반응에서 보이는 미세구조의 변화로는, 급성 비염시 정도의 차이는 있지만 섬모의 파괴, 섬모상피세포의 탈락, 미토콘드리아의 증가, 세포질내 공포형성 등이 관찰된다. 이러한 변화는 이차 감염이 없으면 대부분 정상으로 회복이 된다[16]. 급, 만성 부비동염시 점막의 변화양상으로는 주사 전자현미경상 섬모세포의 감소 또는 소실, 불규칙한 배열을 갖는 재생 섬모 등이, 투과 전자현미경 소견으로 국소적인 세포의 손상, 섬모세포의 공포성 변성, 유착형의 복합섬모등이 관찰된다[17]. 윤주헌 등[18]에 의하면 통년성 알레르기성 비염환자에서 얻은 코점막 상피세포의 투과 전자현미경 소견상 세포간 간격이 증가하나 tight junction부위는 계속 유지되고 주사 전자현미경상 세포의 배열이 유지된다고 하였다. 이러한 결과는 본 실험에서 관찰된 1ng/ml 이상의 TNF-α 첨가 배양시 투과 전자현미경상의 세포간 간격 증가양상과 일치하였다. 이와 같이 tight junction은 유지되므로 세포하부에서는 부종이 있지만 주사 전자현미경상 세포들의 배열이 대부분 정상적인 것으로 관찰되는 것으로 생각되었다. 본 실험에서 관찰된 TNF-α에 의한 미세구조의 변화는 생체에서의 소견과 대부분 일치하므로 코점막의 염증시 나타나는 상피세포의 변화에 TNF-α가 깊은 관련이 있을 것으로 생각되었다.

TNF-α 1ng/ml 이상의 농도에서 주사 전자현미경상 분비상피세포의 면적과 분비물의 증가소견이 관찰되었다. 그러나 분비상피세포의 면적이 증가한 것이 세포수가 증가한 것인지 혹은 세포의 부종으로 인해 세포의 크기가 증가한 결과인지를 감별해야 한다. 이는 세포의 크기 및 세포수를 계측해야 가능한 것이므로 본 연구로는 알 수 없었고 다만 투과 전자현미경상 섬모상피세포

내에 미토콘드리아 증가하며 세포간 부종 및 섬모의 손상 등의 소견으로 미루어 세포부종으로 추정되나 이에 대한 검증이 필요하리라 생각한다. 그리고 분비물이 증가한 소견은 분비세포수가 증가된 결과인지 또는 분비세포의 분비능력이 향상된 결과인지 감별해야 한다. 이에 대해서는 상반된 의견이 존재한다. Yanagisawa등[14]은 쥐 신우 상피세포에 대한 실험에서 TNF-α의 농도가 50ng/ml 이하에서는 세포수가 증가하고 100ng/ml의 농도에서는 억제된다고 하였다. Sleigh등[19]은 사람 코점막에 염증이 생기면 배세포 및 점막하 선조직의 현저한 증식 등이 보인다고 하여 분비물의 증가가 세포수의 증가에 의해서 나타날 가능성을 제시하였다. 한편 알레르기성 비염이나 급성 비염시 보이는 비루의 증가는 삼투액의 증가나 분비선의 활동 증가에 기인한다는 보고가 있다[20]. 이처럼 증가된 분비능력과 수적 증가중 어느 것이 분비물의 증가와 관련이 있는지는 본 실험에서는 세포분화와 관련된 세포수의 변화를 측정하지는 않았으므로 이를 알 수가 없었다. 추후 이에 대한 실험을 통해 세포수의 변화를 측정해야 하며, 분비물의 양적 증가에 대한 분자생물학적 연구에 의해 이런 점들을 정확히 평가해야 할 것이다.

이상의 결과처럼 TNF-α에 의해 섬모상피세포 및 분비상피세포에 직접적인 미세구조의 변화가 일어나는 기전으로는 TNF 수용체 α와 β의 친화력 및 각 수용체의 고유한 작용에 의한 것으로 생각된다. TNF 수용체 α는 세포의 용해에 관여하며, 수용체 β는 염증시 임파구의 활성화 및 염증증강의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 한편 TNF-α와의 친화력은 TNF 수용체 β가 더 강하므로[5], 본 실험의 결과도 TNF 수용체 β가 자극되어 분비물이 증가하며 분비상피세포의 면적이 증가한 것으로 생각된다. 또한 TNF 수용체 α가 자극되어 세포의 용해와 관련된 섬모의 손실, 미토콘드리아의 증가 및 공포화, 세포간 간격의 증가 등의 소견이 보였다고 추측할 수 있다.

## 결 론

사람 코점막 상피세포를 배양하여 TNF-α에 의해 코점막 상피세포의 미세구조에 변화가 유도되는 지를 보고자 floating 14일째 TNF-α를 0.1, 1, 10, 100ng/ml의 농도로 48시간 첨가 배양 후 주사 및 투과 전자현미경으로 관찰한 결과, TNF-α 첨가 배양시 1ng/ml의 농도부터 미세구조의 변화가 관찰되었으며 변화의 양상은 섬모의 손상, 섬모상피세포내 공포형성 및 세포간격 증가, 분비상피세포 면적의 증가, 분비물의 증가 등의 소견이 관찰되어 생체의 급, 만성 비염소견과 일치하는 양상이었다. 이러한 소견은 TNF-α에 의해 직접적으로, 배양된 사람 코점막 상피세포의 미세구조에 변화가 발생한다는 것을 의미하여 또한 이러한 소견은 급, 만성 염증시 보이는 미세구조의 변화와 일치하는 소견이므로 TNF-α가 코점막의 급, 만성 염증에 직접적으로 관여한다 하겠다. 향후 상기 변화의 복원성 여부와 세포수 및 크기의 계측에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

## References


1) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B : *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. Proc Natl Acad Sci USA. 1975 ; 72 : 3666-3670*
2) Kawakami M, Pekala PH, Lane MD, Cerami A : *Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1982 ; 79 : 912-916*
3) Vilcek J, Lee TH : *Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple action. J Biol Chem, 1991 ; 266(12) : 7313-7316*
4) Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, et al : *The human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequence. Cytokine. 1990 ; 2(4) : 231-237*
5) Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Goeddel DV : *The two different receptors for tumor necrosis factor distinct response. Proc Natl Acad Sci USA. 1991 ; 88 : 9292-9296*
6) Kwon OJ, Au BT, Collins PD, et al : *Tumor necrosis factor-induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cells. Am J Physiol. 1994 ; 267 : L398-L405*

7) Becker S, Koren HS, Henke DC : *Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokine tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6. Am J Respir Cell Mol Biol. 1993 ; 8 (1) : 20-27*
8) Bradding P, Mediwake R, Feather IH, et al : *TNF alpha is localized to nasal mucosal mast cells and is released in acute allergic rhinitis. Clin Exp Allergy. 1995 ; 25 (5) : 406-415*
9) Yoon JH, Lee JG, Choi JW, Park IY : *Differentiation of human nasal epithelial cells (HNEC) by floating method. Korean J Otolaryngol. 1995 ; 38 (8) : 1201-1205*
10) Lee JG, Yoon JH, Lee MH, Park IY : *Differentiation of human nasal epithelial cells (NHEC) by floating method-A scanning electron microscopic study. Korean J Otolaryngol. 1995 ; 38 (9) : 1326-1335*
11) Poliquin JF, Grepeau J : *Immune defence mechanisms of the nasal mucosa. J Otolaryngol. 1985 ; 14 : 80-84*
12) Waage A, Halstensen A, Espevik T : *Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. Lancet. 1987 ; 1 (8529) : 355-357*
13) Bachert C, Hauser U, Prem B, Rudack C, Ganzer U : *Proinflammatory cytokines in allergic rhinitis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1995 ; 252 : S44-S49*
14) Yanagisawa M, Imai H, Fukushima Y, Yasuda T, Miura AB, Nakamoto Y : *Effects of tumor necrosis factor-α and interleukin 1β on the proliferation of cultured glomerular epithelial cells. Virchows Arch. 1994 ; 424 : 581-586*
15) Margot M, Shoemaker SF, Darcy KM : *Regulation of rat mammary epithelial cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-α. Endocrinology. 1992 ; 130 (5) : 2833-2844*
16) Turner RB, Hendley OH, Gwaltney JM : *Shedding of infected ciliated epithelial cells in rhinovirus colds. J Infect Dis. 1982 ; 145 : 849-853*
17) Ohashi Y, Nakai Y, Ikeoka H, Furuya H : *Regeneration of nasal mucosa following mechanical injury. Acta Otolaryngol Suppl. 1991 ; 486 : 193-201*
18) Yoon JH, Lee JG, Kim HN, Chung SK, Park IY : *Ultrastructure of the nasal mucosal epithelium in perennial allergic rhinitis. Korean J Otolaryngol. 1990 ; 33 (3) : 471-481*
19) Sleigh MA, Blake JR, Liron N : *The propulsion of mucus by cilia. Am Rev Respir Dis. 1988 ; 137 : 726-741*
20) Jahnke V : *Electron microscopic study of the normal and allergic nasal mucosa. Acta Otorhinolaryngol (Belg). 1978 ; 32 : 48-55*